

**Fluoreszenz-Quenchen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-
Hybridisierungsereignissen bei hohen Salz-Konzentrationen**

5

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen.

10

Stand der Technik

15 In der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor werden Immunoassays und zunehmend auch die Sequenzanalyse von DNA und RNA eingesetzt. Neben den bekannten seriellen Verfahren mit autoradiographischer oder optischer
20 Detektion finden zunehmend parallele Detektionsverfahren mittels Array-Technologie, sogenannten DNA- oder Protein-Chips, Verwendung. Auch bei diesen parallelen Verfahren beruht die Detektion auf optischen, radiographischen, massenspektrometrischen oder elektrochemischen Methoden.

Zur Genanalyse auf einem Chip wird auf einer Oberfläche eine Bibliothek bekannter DNA-
25 Sequenzen ("Sonden-Oligonukleotide") in einem geordneten Raster fixiert, so dass die Position jeder individuellen DNA-Sequenz bekannt ist. In der Untersuchungslösung anwesende Fragmente aktiver Gene ("Target-Oligonukleotide"), deren Sequenzen zu bestimmten Sonden-Oligonukleotiden auf dem Chip komplementär sind, können durch Nachweis der entsprechenden Hybridisierungsereignisse auf dem Chip identifiziert
30 werden. Im Allgemeinen erfolgt die Analyse über optische (oder autoradiographische) Detektionsverfahren unter Verwendung von Target-Oligonukleotiden, die mit einem Radiolabel (z.B. ^{32}P) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein, Cy3TM oder Cy5TM) markiert sind. Die Verwendung von Fluoreszenzlabel und entsprechenden Fluoreszenz-Scannern überwiegt dabei zunehmend die Anwendung von Radiolabel. Die
35 zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Fluoreszenz-Scanner ermöglichen den Nachweis von Fluorophoren im Subattomol-Bereich.

Die Verwendung von markierten Targets zum Nachweis von Hybridisierungsereignissen beinhaltet jedoch einige Nachteile. Zum einen muss die Markierung vor der eigentlichen Messung erfolgen, was einen zusätzlichen Syntheseschritt und damit zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet. Zudem ist es schwierig, eine homogene Markierung des Probenmaterials zu gewährleisten. Außerdem sind stringente Waschbedingungen notwendig, um im Anschluss an eine Hybridisierung nicht oder unspezifisch gebundenes Material zu entfernen.

- 10 Sowohl für die Protein- als auch für die DNA-Analyse ist es daher wünschenswert und für den Anwender vorteilhaft, wenn die Targets (Antikörper bzw. Antigen oder DNA-Fragment) nicht mit einem Detektionslabel modifiziert werden müssten.

Die Nachteile der Markierung des Probenmaterials mit radioaktiven Elementen oder Fluoreszenzfarbstoffen können umgangen werden, wenn an Stelle der Targets die Sondenmoleküle mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Nach diesem Prinzip funktionieren die sogenannten molekularen Leuchten (molecular beacons). Diese einsträngigen Oligonukleotide weisen eine Haarnadelstruktur (hairpin, stem-and-loop) auf und tragen am einen Ende der Sequenz einen Fluorophor (z.B. Fluorescein, TexasRed®) und am anderen Ende der Sequenz einen geeigneten Fluoreszenzlöcher (z.B. DABCYL). Durch die spezielle geometrische Anordnung befinden sich die fluoreszierende Gruppe und die Einheit, die zur Löschung der Fluoreszenz führt, in räumlicher Nähe zueinander. Daher zeigen die Sonden nur eine äußerst geringe Fluoreszenz. In Gegenwart der entsprechenden zur Sequenz der Schlinge (loop) komplementären Sequenz (Target) erfolgt die Hybridisierung in diesem Bereich. Dies führt zu einer Änderung der Konformation und zur Trennung von Fluorophor und Quencher, was als starke Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden kann.

Neben organischen Molekülen (wie DABCYL) werden auch Gold-Nanopartikel als effiziente Quencher eingesetzt (vgl. Nature Biotech. Vol. 19, 2001, Seite 365). Das Quenchen der Fluoreszenz durch Metalle beruht primär auf einem strahlungslosen Energietransfer vom Farbstoffmolekül zum Metall. Bei Verwendung von Gold-Nanopartikeln wird eine größere Sensitivität beobachtet als bei organischen Quenchern. Außerdem werden Farbstoffe bis in den nahen Infrarot-Bereich effizient gequencht. Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings darin, dass Gold-Nanopartikel bei Temperaturen über 50°C nicht mehr stabil sind. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass diese Methode

auf die Untersuchung von Lösungen beschränkt ist und daher nur wenige Sequenzen zur gleichen Zeit untersucht werden können, der Parallelisierungsgrad dieses Ansatzes also gering ist.

- 5 Aus dem Stand der Technik sind auch Untersuchungen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen bekannt (T. Neumann, Dissertation "Strategies for Detecting DNA Hybridisation Using Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy", Mainz, Juni 2001). Aus dieser Arbeit geht hervor, dass die Salz-Konzentration in der die Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung
- 10 einen Einfluss auf die Konformation der Nukleinsäure-Oligomere ausübt. Es wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung um einen Faktor 1,75 festgestellt, was zu einer unbefriedigenden Nachweisgrenze, insbesondere bei parallelen Verfahren, führt.
- 15 Obwohl es also viele Detektionsmöglichkeiten für Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignisse gibt, ist der Bedarf an einfachen, kostengünstigen, problemlos durchzuführenden und verlässlichen Detektionsprinzipien vor allem im Bereich der weniger dichten Array-Technologien (DNA- und Protein-Chips mit wenigen einzelnen bzw. bis zu mehreren hunderttausend Test-Sites pro cm^2 z.B. für sogenannte POC (Point of
- 20 Care)- Systeme bzw. für high throughput screening - HTS - Systeme) hoch.

Darstellung der Erfindung

25

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden bereit zu stellen, welches die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist.

- 30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 und durch den Kit gemäß unabhängigem Anspruch 11 gelöst.

Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den

35 Beispielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

Genetik

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat-Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat-Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA.)
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z.B. auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z.B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Bindung natürlich vorkommender cDNA oder RNA.
nt	Nukleotid
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z.B.

	Nukleinsäure-Oktamer: Eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei der 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
ns-Oligomer	Nukleinsäure-Oligomer
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
Mismatch	Zur Ausbildung der Watson-Crick-Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.
ss	single strand (Einzelstrang)
ds	double strand (Doppelstrang)

Substanzen

Fluorophor	chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind in der Regel um 15 bis 40 nm verschoben (Stokes-Shift).
FP	Fluorophor
Cy3™	5,5'-disulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)

Cy5™	5,5',7,7'-tetrasulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3',3'-tetramethylbenzindodicarbocyanin (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)
Fluorescein	Resorcinphtalein (Fluoreszenzfarbstoff)
Rhodamin 6G	Basic Red 1 (Fluoreszenzfarbstoff)
Texas Red®	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Molecular Probes, Inc.
DABCYL	4-((4'-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure
Fluoreszenzlöschung	strahlungsloser Energietransfer
Fluoreszenz-Quenchen	Fluoreszenzlöschung
Quench-Oberfläche	leitende (Metall)-Oberfläche, die durch einen Energietransfer Fluoreszenz löschen kann (insbesondere Gold-, Silber-, Kupfer-Oberflächen usw.)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)
Linker	molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Hetero-Alkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit dem entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1 - 60, insbesondere der Kettenlänge 5 - 40, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, einem Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Spacer	Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 60, insbesondere der Kettenlänge 5 - 40, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.
--------	---

Modifizierte Oberflächen/Elektroden

<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-FP</i>	Gold-Oberfläche mit kovalent aufgebracht Monolayer aus derivatisiertem Einzelstrang-Oligonukleotid. Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH ₂) ₂ -S) ₂ zum P-O-(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Am freien Ende trägt das Sonden-Oligonukleotid einen kovalent angebunden Fluorophor (FP) wie z.B. Cy3™, Cy5™, Texas Red®, Rhodamin 6G, Fluorescein etc.
<i>Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-FP</i>	<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-FP</i> hybridisiert mit dem zu ss-oligo komplementären Oligonukleotid.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das
- 5 Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren, wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind. Die weiteren Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Inkontaktbringen der Probe
 - 10 mit der modifizierten Oberfläche, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der bei der Detektion bestimmten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.
 - 15 In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist ein Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensitäten mit Referenzwerten erforderlich. Diese Referenzwerte können aus vorangegangenen Messungen bereits vorliegen und brauchen daher im

allgemeinsten Fall nicht im Laufe des erfindungsgemäßen Verfahrens detektiert werden. Da die Referenzwerte aber im Idealfall unter exakt den gleichen äußeren Bedingungen bestimmt werden sollen wie die eigentlichen Messwerte der Fluoreszenzintensitäten, wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vor dem

5 Inkontaktbringen der Targets (Probe) mit der modifizierten Oberfläche eine erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors durchgeführt. Dazu wird eine definierte Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung eingestellt, wobei dieselbe Salzkonzentration wie bei der zweiten Detektion der

10 Fluoreszenz des Fluorophors verwendet wird, dann erfolgt die erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors. Anschließend werden Stringenzbedingungen für die Hybridisierung eingestellt und die Probe mit der modifizierten Oberfläche in Kontakt gebracht. Die bei dieser ersten Fluoreszenzdetektion erhaltenen Werte werden dann als Referenzwerte verwendet und mit den bei der zweiten Fluoreszenzdetektion erhaltenen Werten verglichen.

15

Das Einstellen der Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und das Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche kann grundsätzlich in jeder beliebigen zeitlichen Abfolge durchgeführt werden. Bevorzugt werden die Stringenzbedingungen für die Hybridisierung gleichzeitig mit dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten

20 Oberfläche eingestellt oder das Einstellen der Stringenzbedingungen für die Hybridisierung erfolgt nach dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche.

25

Gemäß den nachfolgend geschilderten, besonders bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird zusätzlich eine Normierungsmessung durchgeführt. Auf der modifizierten Oberfläche sind in diesen Fällen Sites aufgebracht, denen nach Zugabe der Probe ein ganz bestimmter Assoziationsgrad zugeordnet werden kann. Das bei der Detektion erhaltene Signal ist dann für diesen bestimmten Grad an Assoziation charakteristisch und kann zur Normierung der Signale der Test-Sites herangezogen

30 werden.

35

Die vorliegende Erfindung umfasst nämlich auch Verfahren, in denen eine modifizierte Oberfläche verwendet wird, die durch Anbindung von wenigstens zwei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert wurde. Die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren sind in räumlich im wesentlichen abgetrennten

Bereichen an die Oberfläche gebunden. Unter "im wesentlichen abgetrennten Bereichen"

werden Bereiche der Oberfläche verstanden, die ganz überwiegend durch Anbindung einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert sind. Lediglich in Gebieten, in denen zwei solche im wesentlichen abgetrennte Bereiche aneinander grenzen, kann es zu einer räumlichen Vermischung von verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren kommen. In dem im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugten Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der Zusatz von einem Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei das Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren ist, die in einem bestimmten Bereich (Site T_{100}) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das Nukleinsäure-Oligomer wird dabei in einer Menge zu der Probe zugegeben, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren. Den letzten Schritt dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert. Der für den Bereich T_{100} erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei vollständiger Assoziation (100%).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine modifizierte Oberfläche verwendet, die durch Anbindung von wenigstens drei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert wurde. Die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren sind in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden. Dabei ist wenigstens eine Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomer in einem bestimmten Bereich (Site T_0) an die Oberfläche gebunden, von dem bekannt ist, dass in der Probe kein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante enthalten ist, also das entsprechende Nukleinsäure-Oligomer nicht in der Probe vorkommt. Auch in diesem besonders bevorzugten Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der Zusatz von einem Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei das Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren ist, die in einem bestimmten Bereich (Site T_{100}) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das Nukleinsäure-Oligomer wird dabei in einer Menge zu der Probe zugegeben, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren. Den letzten Schritt dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich

T_{100} erhaltenen Wert und mit dem für den Bereich T_0 erhaltenen Wert. Der für den Bereich T_0 erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei fehlender Assoziation (0%).

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der oben geschilderten

5 Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der Zusatz von wenigstens einer weiteren Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei bekannt ist, dass dieses Nukleinsäure-Oligomer in der ursprünglichen Probe nicht

10 enthalten ist. Diese weitere Art von Nukleinsäure-Oligomer weist eine Assoziationskonstante >0 zu einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren auf, die in einem bestimmten Bereich (Site T_n) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das

15 Nukleinsäure-Oligomer wird in einer solchen Menge zu der Probe gegeben, dass nach dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche $n\%$ der modifizierten Nukleinsäure-Oligomere des Sites T_n in assoziierter Form vorliegen. Den letzten Schritt dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des

20 Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem für den Bereich T_0 erhaltenen Wert und mit den für die Bereiche T_n erhaltenen Werten. Der für ein bestimmtes Test-Site T_n erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei Vorliegen von $n\%$ Assoziaten aus modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren und Target-Nukleinsäure-Oligomeren bezogen auf die Gesamtzahl an modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der

Die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die mit der modifizierten Oberfläche in Kontakt gebracht werden muss, um eine $n\%$ ige Assoziation am Site T_n zu bewirken, kann vom

25 Fachmann durch einfache Routineuntersuchungen bestimmt werden. Dazu wird z.B. nach Detektion der Werte für T_0 und T_{100} eine kalibrierte Messung durchgeführt, bei der die

Signalintensität von (unterschiedlichen) Detektionslabel bestimmt wird, mit denen die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere und die Target-Nukleinsäure-Oligomere

ausgestattet sind. Das Verhältnis der Intensitäten von Target-Nukleinsäure-Oligomer-Label-Signal zu modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer -Label-Signal entspricht $n\%$.

30 Wird eine genügende Anzahl an Sites T_n auf der modifizierten Oberfläche aufgebracht, so kann eine Normierungskurve mit hoher Genauigkeit aufgenommen werden. Die Normierung der Messungen der eigentlichen Test-Sites mit Hilfe dieser Normierungskurve verbessert die Reproduzierbarkeit der Analytik mit Hilfe der Chip-Technologie deutlich.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass das Auffinden eines Nukleinsäure-Oligomers, das nicht in der Probe enthalten ist, keinerlei Probleme bereitet, da auch die umfangreichsten Genome immer noch eine genügende Auswahl an nicht vorhandenen Sequenzen bieten. Für den Fall, dass sich die nicht vorhandene Sequenz von einer anwesenden Sequenz nur durch eine Base unterscheidet, muss der Hybridisierungsschritt unter stringenten Bedingungen durchgeführt werden. Bevorzugt werden aber Sequenzen verwendet, die sich deutlich, also in mehreren Basen, von den in der Probe anwesenden Sequenzen unterscheiden. Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn für die Test-Sites und für die Normierungssites Oligonukleotide mit der gleichen oder zumindest einer ähnlichen Zahl an Basen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen Kit, der eine modifizierte Oberfläche umfasst, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.

Erfindungsgemäß wird die Detektion der Fluoreszenz nach Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung durchgeführt. Bevorzugte Salzkonzentrationen liegen in den Bereichen zwischen 0,5 und 10 mol/l, zwischen 1 und 10 mol/l, zwischen 0,5 und 3 mol/l und insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l, weil in diesen Bereichen gefunden wurde, dass eine besonders große Differenz in der Fluoreszenzintensität zwischen dem hybridisierten und dem nicht-hybridisierten Nukleinsäure-Oligomer besteht. Dadurch wird eine besonders sichere Detektion der Hybridisierungsereignisse ermöglicht.

Die Quench-Oberfläche

Mit dem Begriff "Oberfläche" wird jedes Trägermaterial bezeichnet, das geeignet ist, direkt oder nach entsprechender chemischer Modifizierung Fluorophor-derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere zu tragen, die kovalent an der Oberfläche immobilisiert sind und deren Fluoreszenz nahe an der Oberfläche (in ca. 1 bis 50 Å Abstand zur Oberfläche) durch Fluoreszenzlöschung (strahlungsloser Energietransfer zwischen dem Fluorophor als Emitter und der Oberfläche als Absorber) signifikant (>10% der erwarteten Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit der Oberfläche bei ansonsten gleichen Bedingungen) reduziert wird. Insbesondere sind Gold und Silber als Quench-

- Oberflächenmaterial geeignet. Die Bezeichnung Oberfläche ist unabhängig von den räumlichen Dimensionen der Oberfläche und beinhaltet auch Nanopartikel (Partikel oder Cluster aus wenigen einzelnen bis mehreren hunderttausend Oberflächen-Atomen oder -Molekülen). Die Oberfläche kann zusätzlich an einen festen Träger wie z.B. Glas, Metall
- 5 oder Plastik gebunden vorliegen.

Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche

- 10 Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäure-Oligomeren an einer Oberfläche sind dem Fachmann bekannt. Die Immobilisierung kann z.B. kovalent über Amino-, Hydroxyl-, Epoxid- oder Carboxygruppen des Trägermaterials mit natürlicherweise am Nukleinsäure-Oligomer vorhandenen oder durch Derivatisierung am Nukleinsäure-Oligomer angebrachten Thiol-, Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen erfolgen. Das
- 15 Nukleinsäure-Oligomer kann direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche verbunden werden. Daneben kann das Nukleinsäure-Oligomer durch die bei Immunoassays üblichen Methoden verankert werden wie z.B. durch Verwendung von biotinylierten Nukleinsäure-Oligomeren zur nicht-kovalenten Immobilisierung an Avidin oder Streptavidin-modifizierten Oberflächen. Die
- 20 chemische Modifikation der Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren mit einer Oberflächen-Ankergruppe kann bereits im Verlauf der automatisierten Festphasensynthese oder aber in gesonderten Reaktionsschritten eingeführt werden. Dabei wird auch das Nukleinsäure-Oligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann
- 25 auf verschiedene, aus dem Stand der Technik bekannten Arten durchgeführt werden (vgl. z.B. Hartwich, G.: ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION VON SEQUENZSPEZIFISCHEN NUKLEINSÄUREOLIGOMERHYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN (1999), WO 00/42217).

- Bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberflächen ist auf einen
- 30 besonders wichtigen Punkt zu achten. Grundsätzlich herrschen zur Detektion der Differenz der Fluoreszenzintensität von hybridisierten Nukleinsäure-Oligomeren und einsträngigen Nukleinsäure-Oligomeren dann besonders günstige Bedingungen, wenn der Fluorophor sich in nur einem der Zustände "hybridisiert" oder "nicht hybridisiert" möglichst nahe an der modifizierten Oberfläche befindet. Das Ausmaß des Quench-
- 35 Vorgangs verändert sich ja bekanntermaßen mit einer höheren (dritte bis sechste) Potenz des Abstandes zwischen Quench-Oberfläche und Fluorophor. Solche besonders

günstigen Bedingungen können nur mit speziellen Anbindungstechniken erreicht werden. Es muss bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere darauf geachtet werden, dass diese entweder völlig ohne weiteres Co-Adsorbat an die Oberfläche gebunden werden oder, falls ein Co-Adsorbat notwendig erscheint, dass dieses eine möglichst dünne

5 Schicht über der Oberfläche ausbildet. Es muss also entweder eine direkte Anbindung des Nukleinsäure-Oligomers an die Oberfläche erfolgen oder eine Belegung zusammen mit möglichst kurzkettigen Co-Adsorbaten wie z.B. kurzkettigen Thiolen. Bevorzugt werden Co-Adsorbate der Kettenlänge 1 bis 30, bevorzugt 1 bis 20, besonders bevorzugt 1 bis 10, insbesondere bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 5.

10

Insbesondere nachteilig ist in diesem Zusammenhang eine Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere in Form einer Verbindung Oberfläche-Biotin-Avidin-Biotin-Oligomer. Bei einer solchen Anbindung ist der Fluorophor immer durch eine sehr dicke Schicht aus Biotin-Avidin-Biotin von der Oberfläche abgeschirmt, was mit entsprechenden Nachteilen in der

15 Detektion der Fluoreszenz einhergeht.

Fluorophore

20 Als Fluorophore werden kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Texas Red®, Rhodamin-Farbstoffe, Cyaninfarbstoffe wie z.B. Cy3™, Cy5™, Fluorescein etc (vgl. Fluka, Amersham und Molecular Probes Katalog) verwendet.

25 Fluoreszenzlöschung

Mit Fluoreszenzlöschung wird die Deaktivierung einer elektronisch angeregten Spezies über einen strahlungslosen Prozess bezeichnet. Die Deaktivierung kann durch Stöße oder auch durch strahlungslose Energieübertragung auf Metalle erfolgen. Die freiwerdende

30 Energie wird als thermische Energie dissipiert. Gold ist ein Beispiel für ein Metall, das die Fähigkeit zur Fluoreszenzlöschung besitzt. Die Löschung weist eine starke Abhängigkeit vom Abstand des Fluorophors von der als Fluoreszenzlöcher fungierenden Oberfläche auf (umgekehrt proportional zu einer höheren (dritte bis sechste) Potenz des Abstands). Der Effekt der Fluoreszenzlöschung ist daher nur bei Abständen kleiner 100 bis 200 Å

35 messbar. Im Bereich größer als ca. 200 Å führen weitere Abstandsänderungen nicht mehr zu einer messbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

5

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen;

Fig. 2 A: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche;

B: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche.

Bezugszeichenliste

10

102: Fluorophor

201: einsträngige Oligomer-Sonde

202: Sonde hybridisiert mit Target

203: Oberfläche (z.B. Gold)

15

204: Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche vor der Hybridisierung

205: Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche nach der Hybridisierung

20

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen. In Figur 1A ist der Fall dargestellt, dass das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quenchender Metalloberfläche charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verringert sich der Abstand 205 zwischen dem

25

fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm der Figur 1A). Figur 1B zeigt den Fall, dass das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen
5 geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quencher Metalloberfläche 203 charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) vergrößert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm
10 der Figur 1B).

Figur 2A zeigt eine Auftragung der Fluoreszenz-Intensitäten einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche. Gemessen wurde die
15 Fluoreszenzintensität von 200 µm-Spots von auf einer 1 cm² großen Gold-Platte immobilisierten Einzelstrang-Sondenoligonukleotiden (20 mer und 30 mer) mit Cy3TM als kovalent angebundenem Fluorophor. Die Auftragung gemäß Figur 2B zeigt die Fluoreszenz-Intensität vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von
20 der Salzkonzentration der Lösung über der Oberfläche unter ansonsten gleichen Bedingungen wie in Zusammenhang mit Figur 2A beschrieben. Aus der Figur 2B geht deutlich hervor, dass sich bei Salzkonzentrationen von mehr als 0,5 mol/l die Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung um bis zu einem Faktor 5 erhöht. Dies erlaubt auch bei parallelen Verfahren eine eindeutige Detektion der erfolgten
25 Hybridisierungen.

Wege zur Ausführung der Erfindung

30

Um die Vorteile der DNA-Chip-Technologie auf die Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden durch Modulation des Fluoreszenzquenchers anzuwenden, werden verschiedene modifizierte Nukleinsäure-Oligomer-Sonden unterschiedlicher Sequenz mit den oben beschriebenen Immobilisierungstechniken an einen Träger gebunden. Mit der
35 Anordnung der Nukleinsäure-Oligomer-Sonden bekannter Sequenz an jeder Position der Oberfläche, einem DNA-Array, soll das Hybridisierungsereignis eines beliebigen Target-

Nukleinsäure-Oligomeren oder einer (fragmentierten) Target-DNA detektiert werden, um z.B. Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer Oberfläche die Oberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. In einer allgemeinsten Ausführungsform kann der DNA-Chip auch mit einem einzigen Sonden-Oligonukleotid derivatisiert werden. Als Sonden-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z.B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 70, bevorzugt der Länge 5 bis 60, besonders bevorzugt der Länge 10 bis 50, insbesondere bevorzugt der Länge 12 bis 40 verwendet.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Target-Oligonukleotide auch eine größere Anzahl an Basen umfassen können, also länger sein können, als die Sonden-Oligonukleotide. In diesem Fall wird unter dem Ausdruck "zum Sonden-Oligonukleotid komplementäres Nukleinsäure-Oligomer" ein Nukleinsäure-Oligomer verstanden, das eine Basensequenz aufweist, die in einem Teilbereich zu dem Sonden-Oligonukleotid komplementär ist. Der/die restlichen Abschnitte des Nukleinsäure-Oligomers ragen dann an dem/den Enden des Sonden-Oligonukleotids über dessen Basenkette hinaus.

An den so bereitgestellten Oberflächen mit immobilisierten und Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotiden wird in einer Referenzmessung, z.B. mit einem Fluoreszenz-Scanner, die Fluoreszenzintensität der Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotide im einsträngigen Zustand bei einer definierten, zuvor eingestellten Salzkonzentration in der umgebenden Lösung bestimmt.

Im nächsten Schritt wird die (möglichst konzentrierte) Untersuchungslösung mit Target-Oligonukleotid(en) unter für die Hybridisierung stringenten Bedingungen zur Oberfläche mit immobilisierten Sonden-Oligonukleotiden gegeben. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Target-Nukleinsäure-Oligomer-Stränge enthält, die zu den an die Oberfläche gebundenen Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind.

Nach der Hybridisierung zwischen Sonde und Target wird wiederum eine definierte Salzkonzentration eingestellt und dann in einer zweiten Fluoreszenzmessung die Fluoreszenzintensität im hybridisierten, doppelsträngigen Zustand bestimmt.

Die Differenz aus Referenzmessung und zweiter Messung je Test-Site ist proportional zur Anzahl der ursprünglich in der Untersuchungslösung für das jeweilige Test-Site vorhandenen komplementären (bzw. in weiten Bereichen komplementären) Target-Oligonukleotide.

5

Gemäß einem alternativen Verfahren kann die Referenzmessung weggelassen werden, wenn die Größe des Referenzsignals vorher (z.B. durch vorausgegangene Messungen etc.) hinlänglich genau bekannt ist.

- 10 Aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich der Abstand zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche. Aufgrund des veränderten Abstandes erfährt auch das Ausmaß des Quench-Vorgangs und damit die Intensität der Fluoreszenz eine starke Änderung. Somit
- 15 kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch fluoreszenzbasierte Verfahren wie z.B. Fluoreszenzmikroskopie oder Messungen mit Fluoreszenz-Scanner detektiert werden.

- Durch eine gezielte Beeinflussung des Salzgehalts der Lösung lassen sich für das
- 20 einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer verschiedene räumliche Anordnungen realisieren:

- a) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und
- 25 quencher Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (hohe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Verringerung des Abstands zu einer Vermehrung des Quenchens kommt und
- 30 eine geringere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung beobachtet werden kann (siehe Figur 1A).

- b) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und
- 35 quencher Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (geringe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang

202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Vergrößerung des Abstands zu einer Verringerung des Quenchens kommt und eine höhere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung
5 beobachtet werden kann (siehe Figur 1B).

Die beiden oben dargestellten geometrischen Anordnungen können durch die Variation der Ionenstärke, insbesondere der Salzkonzentration erreicht werden. Dabei können beliebige Salze verwendet werden mit Ausnahme von bivalenten Salzen (z.B. Mg^{2+}) oder
10 chaotropen Salzen. Bei niedrigem bis mittlerem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher gestreckten Konformation vor (siehe Figur 1A). Durch die Hybridisierung wird eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1A, 2B). Bei hohem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher komprimierten Konformation vor (siehe Figur 1B). Durch
15 die Hybridisierung wird eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1B, 2B).

20

Ausführungsformen

Die n Nukleotide (nt) lange Nukleinsäure-Sonde (DNA, RNA oder PNA, z.B. ein 20 Nukleotide langes Oligo) ist in der Nähe eines ihrer Enden (3'- oder 5'-Ende) direkt oder über einen (beliebigen) Spacer mit einer reaktiven Gruppe zur kovalenten Verankerung an
25 der Oberfläche versehen, z.B. als 3'-Thiol-modifiziertes Sonden-Oligonukleotid, bei dem die endständige Thiolmodifikation als reaktive Gruppe zur Anbindung an Gold dient. Weitere kovalente Verankerungsmöglichkeiten ergeben sich z.B. aus aminmodifiziertem Oligonukleotid, das zur Verankerung an oberflächlich gebundene Carbonsäurefunktionen (z.B. über säurefunktionalisierte Thiole wie Mercaptopropionsäure und eine Aktivierung
30 z.B. als Aktivester) verwendet wird. In der Nähe des anderen Terminus des Sondenoligonukleotids ist ein Fluorophor kovalent angebunden (vgl. Beispiel 1). Die so modifizierte Nukleinsäure-Sonde wird

(i) in Puffer (z.B. 10 - 500 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit
35 der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des

Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden oder

- 5 (ii) in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers in Puffer (z.B. 100 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA, 0,1 - 1 M NaCl) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden, wobei darauf geachtet wird, dass genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt wird (etwa 0.1 bis 10 facher Überschuss), um zwischen den einzelnen Sonden-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit den Target-Oligonukleotid zur Verfügung zu stellen oder
- 10
- 15 (iii) in Puffer (z.B. 10 - 350 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden. Anschließend wird die so modifizierte Oberfläche mit dem entsprechenden monofunktionalen Linker in Lösung (z.B. Alkanthiole oder ω -Hydroxy-Alkanthiole in Phosphat-Puffer/EtOH-Mischungen bei Thiol-modifizierten Sondenoligonukleotiden) in Kontakt gebracht, wobei der monofunktionale Linker über seine reaktive Gruppe an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche anbindet (vgl. Abschnitt "Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche").
- 20
- 25 Die (Rest-) Fluoreszenz des Fluorophors am Sonden-Oligonukleotid wird durch ein geeignetes Verfahren detektiert, z.B. durch Fluoreszenzmessung mit einem Fluoreszenz-Scanner in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen (vgl. Beispiel 7). Die Fluoreszenzintensität des einsträngigen Sonden-Oligonukleotids zeigt ein Maximum bei einer Salzkonzentration zwischen 0,05 und 0,25 mol/l (siehe Figur 2A). Anschließend wird
- 30 das gelöste Target zugegeben, potentielle Hybridisierungsereignisse werden unter geeigneten, dem Fachmann bekannten Bedingungen ermöglicht (beliebige, frei wählbare Stringenzbedingungen der Parameter Potential/Temperatur/Salz/chaotrope Salze etc. für die Hybridisierung) und die Messung zur Detektion des Fluorophors bei einer der Salzkonzentration der ersten Detektion entsprechenden Salzkonzentration wiederholt.

Der Unterschied im Messsignal (Ab- bzw. Zunahme, je nach Salzkonzentration, vgl. Fig. 1) ist proportional zur Anzahl der Hybridisierungsereignisse zwischen Sonden-Nukleinsäureoligomer auf der Oberfläche und passendem Target-Nukleinsäure-Oligomer in der Untersuchungslösung (vgl. Bsp. 8).

5

Das beschriebene Verfahren kann für eine Targetart (z.B. eine bestimmte Targetoligonukleotid-Art mit bekannter Sequenz) an einer Oberfläche oder - bei Verwendung jeweils verschiedener Sonden-Arten für jedes Test-Site - für mehrere Target-Arten (mehrere verschiedene Target-Oligonukleotid-Arten) angewendet werden.

10

Beispiel 1

Darstellung der aminomodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten Goldoberflächen als Sondenoligonukleotide

15

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Der Amino-Modifier C2 dT (Glen Research 10-1037) wird in die Sequenzen mit den jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

20

25

Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37 °C 16 h entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Die aminomodifizierten Oligonukleotide werden an die entsprechend aktivierten Fluorophore (z.B. Fluoresceinisothiocyanat) gemäß dem Fachmann bekannten Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.

30

35

Beispiel 2

Darstellung der fluorophormodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten Goldoberflächen als Sondenoligonukleotide

5

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die
10 Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Die Fluorophore werden am Synthesizer beim letzten Kopplungsschritt als Phosphoramidite (Glen Research 10-1037) in die Sequenzen mit dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die
15 Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

Beispiel 3

20

Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3'
25 (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist der Fluorescein-Modifizier Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10⁻⁵ molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) mit Zusatz von ca. 10⁻⁵ bis 10⁻¹ molarem Propanthiol (oder anderen Thiolen
30 oder Disulfiden geeigneter Kettenlänge) 0,5 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der
35 Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt). Statt des Einzelstrang-

Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

5 **Beispiel 4**

Alternative Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP

Die alternative Herstellung von Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP gliedert sich in 2 Teilabschnitte, nämlich der Derivatisierung der Gold-Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid (Inkubationsschritt) und der Nachbelegung der so modifizierten Elektrode mit einem geeigneten bifunktionalen Linker (Nachbelegungsschritt).

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist Fluorescein-Modifizier Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10⁻⁵ molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) 0,5 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxymercaptoethanols kommt. Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Anschließend wird die so modifizierte Gold-Oberfläche mit einer ca. 10⁻⁵ bis 10⁻¹ molaren Lösung von kurzkettigen Alkanthiolen wie z.B. Propanthiol (in Wasser oder Puffer, pH 7 - 7.5 oder in Ethanol) komplett benetzt und 0,5 - 24 h inkubiert. Das freie Thiol belegt die nach dem Inkubationsschritt verbleibende freie Gold-Oberfläche durch Ausbildung einer Au-S Bindung. Alternativ können auch andere funktionale Thiole oder Disulfide geeigneter Kettenlänge mit den gleichen oder anderen funktionellen Gruppen verwendet werden.

Beispiel 5

Fluoreszenz-Intensitätsmessungen am System Au-ss-oligo-Fluorescein bzw. am System Au-ds-oligo-Fluorescein in Gegenwart von flüssigen Medien

5

Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Bsp. 4 hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [C₃-S-S-C₃-OH] auf Gold immobilisiert (50 µmol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 500 mM, pH 7, Nachbelegung mit Propanthiol 1 mM in Wasser) und in der Form *Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-Fluorescein* die Fluoreszenzintensität der Oberfläche mit einem Fluoreszenz-Scanner der Firma Lavision Biotech in Gegenwart von verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt. Zur Messung der Fluoreszenz in Gegenwart von flüssigen Medien werden 150 µl des Mediums auf die Goldoberfläche gegeben und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Alternativ können auch Hybriwells oder Imaging Chambers verwendet werden.

15

Beispiel 6

20 *Modulation des Abstands über die Ionenstärke/Salzkonzentration*

Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Beispiel 4 hergestellt und analog Beispiel 5 vermessen. Durch Variation der Salzkonzentration (NaCl-Konzentration) in einem Bereich zwischen 1x10⁻⁴ und 3 Mol/Liter wird die geometrische Anordnung der einsträngigen Sonde moduliert. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2A dargestellt. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,5 Mol/Liter, besonders aber im Bereich zwischen 0,05 und 0,25 Mol/Liter ist die Fluoreszenzintensität am höchsten, d. h. der Fluorophor hat den größten Abstand zur Goldoberfläche.

30

Beispiel 7

Fluoreszenzmessung am System Au-ss-oligo/Farbstoff-modifizierte Nukleinsäure-Oligomere in Abwesenheit und in Gegenwart von Target-Oligonukleotid (komplementär zu ss-oligo in Au-ss-oligo)

35

- Gemäß Bsp. 4 wird eine Sonden-Elektrode hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [C₃-S-S-C₃-OH] auf Gold immobilisiert (50 µmol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 500 mM, pH 7). Anschließend werden analog zu Beispiel 6 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Nach Hybridisierung mit komplementären Oligomeren in Phosphat-Puffer (500 mM, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) werden gemäß Beispiel 6 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität für den hybridisierten und den nichthybridisierten Fall in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2B dargestellt.
- Im Bereich oberhalb einer Salzkonzentration von 0,5 Mol/Liter ist die Fluoreszenz nach der Hybridisierung deutlich höher als vor der Hybridisierung. Dieses Ergebnis überrascht, da die Fluoreszenz des Einzelstrangs in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,25 mol/l Salzkonzentration ein Maximum aufweist. Die deutlichste Differenz der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach Hybridisierung zeigt sich jedoch in einem Bereich der Salzkonzentration, in dem die Fluoreszenz des Einzelstrangs deutlich abnimmt (Figur 2B).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen
5 durch Fluoreszenz-Quenchen umfassend die Schritte
- a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der
Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren
besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung
10 wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind,
 - b) Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren,
 - c) Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche,
 - d) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten
Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei eine Salzkonzentration
15 größer 0,5 mol/l eingestellt wird,
 - e) Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102),
 - f) Vergleich der in Schritt e) detektierten Fluoreszenzintensität mit
Referenzwerten.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach Schritt a) und vor Schritt c) die Schritte
- b₃) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten
Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei dieselbe
Salzkonzentration wie in Schritt d) verwendet wird und
25 b₄) erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102)
- durchgeführt werden und als Schritt c) der Schritt
- c) Einstellen von Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und
30 Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche
- durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit den in Schritt
b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.
35
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2, wobei als Schritt a) der Schritt

5 a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung von wenigstens zwei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) besteht und die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden sind und wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind,

10 durchgeführt wird und vor Schritt c) die Schritte

15 b₁) Zusatz von einer Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei die Art von Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante einer in einem bestimmten Bereich T_{100} an die Oberfläche gebundenen Art von modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer (201) ist, wobei das Nukleinsäure-Oligomer in einer Menge zugegeben wird, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere (201) der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren,

20

b₃) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei dieselbe Salzkonzentration wie in Schritt d) verwendet wird,

25

b₄) erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102) und

durchgeführt werden und als Schritt c) der Schritt

30 c) Einstellen von Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche

durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert und den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

35

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei als Schritt a) der Schritt

- 5 a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung von wenigstens drei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) besteht und die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden sind, wobei wenigstens eine Art von modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer (201) in einem bestimmten Bereich T_0 an die Oberfläche angebunden ist, und wobei in der Probe kein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu diesem modifizierten Nukleinsäure-Oligomer enthalten ist und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind,

15 durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_0 erhaltenen Wert und mit den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei vor Schritt c) der Schritt

- 20 b₂) Zusatz von wenigstens einer weiteren Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei diese Art von Nukleinsäure-Oligomer in der in Schritt b) bereitgestellten Probe nicht enthalten ist und das Nukleinsäure-Oligomer eine Assoziationskonstante >0 zu einer in einem bestimmten Bereich T_n an die Oberfläche gebundenen Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren aufweist, wobei das Nukleinsäure-Oligomer in einer Menge zugegeben wird, dass nach Schritt c) n% der modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in dem Bereich T_n in assoziierter Form vorliegen

30 durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_0 erhaltenen Wert, mit den in Schritt b₄) für die Bereiche T_n erhaltenen Werten und mit den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

- 35 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Schritt d) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 10 mol/l, insbesondere zwischen 1 und 10 mol/l eingestellt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei in Schritt d) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 3 mol/l, insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l eingestellt wird.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere 3 bis 70 Basen, bevorzugt 5 bis 60 Basen, besonders bevorzugt 10 bis 50 Basen, insbesondere bevorzugt 12 bis 40 Basen umfassen.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation der
10 Oberfläche in der Anbindung von ausschließlich Nukleinsäure-Oligomeren besteht.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oberfläche zusätzlich durch Anbindung eines kurzkettigen Co-Adsorbats modifiziert ist, insbesondere eines Co-Adsorbats der Kettenlänge 1 bis 30, bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 20, besonders
15 bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 10, insbesondere bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 5.
11. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10 umfassend eine modifizierte Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die
20 Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.